

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

BD

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ :

C07K 15/00, C12N 15/12, 5/10

A1

(11) Numéro de publication internationale: WO 94/24162

(43) Date de publication internationale: 27 octobre 1994 (27.10.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00447

(22) Date de dépôt international: 21 avril 1994 (21.04.94)

(30) Données relatives à la priorité:

93/04670

21 avril 1993 (21.04.93)

FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): VETIGEN [FR/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR). VIRBAC [FR/FR]; 1ère Avenue - 2065 M - L.I.D., F-06516 Carros (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LENZEN, Gerlinda [DE/FR]; 55, rue des Cévennes, F-75015 Paris (FR). KAPOOR, Archana [IN/US]; 8328 Regents Road, no. 38, San Diego, Ca 92122 (US).

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE BOVINE β 3-ADRENERGIC RECEPTOR, AND APPLICATIONS THEREOF(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LE RECEPTEUR β 3-ADRENERGIQUE (RA β 3) BOVIN ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Nucleotide sequences coding for the bovine β 3-adrenergic receptor (RA β 3), use of said sequences as probes and for the expression of peptides and/or fragments thereof having a bovine RA β 3 activity, vector useful for said expression as well as cellular hosts containing said vectors. Method for screening a substance having an agonist or antagonist action with respect to peptides having a β 3-adrenergic receptor activity, particularly selective with respect to the bovine receptor.

(57) Abrégé

Séquences nucléotidiques codant pour le récepteur β 3-adrénergique (RA β 3) bovin, utilisation desdites séquences comme sondes et pour l'expression de peptides et/ou de fragments de ceux-ci ayant une activité de RA β 3 bovin, vecteur utile pour ladite expression ainsi que les hôtes cellulaires contenant ledit vecteur. Procédé de criblage d'une substance, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des peptides ayant une action de récepteur β 3-adrénergiques, particulièrement sélective vis-à-vis du récepteur bovin.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Brazil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Bélarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LV | Lettonie | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | | | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LE RECEPTEUR β 3-ADRENERGIQUE (RA β 3) BOVIN ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des séquences nucléotidiques codant pour le récepteur β 3-adrénergique (RA β 3) bovin, à l'utilisation desdites séquences comme sondes et pour l'expression de peptides et/ou de fragments de ceux-ci ayant une activité de RA β 3 bovin, au vecteur utile pour ladite expression ainsi qu'aux hôtes cellulaires contenant ledit vecteur.

La présente invention est également relative à un procédé de criblage de substances, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des peptides d'origine bovine ayant une activité de récepteur β 3-adrénergique.

Il est connu que les catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline, les agonistes synthétiques de ces catécholamines, qui miment leurs fonctions biologiques et les antagonistes, qui bloquent ces fonctions biologiques, exercent leurs effets en se liant à des sites de reconnaissance (récepteurs membranaires) spécifiques, situés sur les membranes cellulaires.

Deux classes principales de récepteurs adrénergiques ont été définies, les récepteurs adrénergiques α et les récepteurs adrénergiques β .

Dans l'ensemble de ces deux classes, on distingue, maintenant, cinq sous-types de récepteurs aux catécholamines (α 1, α 2, β 1, β 2 et β 3-RA). Leurs gènes ont été récemment isolés et identifiés (S. COTECCHIA et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7159-7163 ; B.K. KOBILKA et al., 1987, Science, 238, 650-656 ; T. FRIELLE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924 ; L.J. EMORINE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 6995-6999 ; L.J. EMORINE et al., 1989, Science, 245, 1118-1121). L'analyse de ces gènes a permis de reconnaître leur appartenance à une famille de récepteurs membranaires intégraux présentant certaines homologies (R.A.F. DIXON et al., 1988, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 221-233 ; L.J. EMORINE et al., 1988,

Proc. NATO Adv. Res. Workshop), notamment au niveau de 7 régions transmembranaires, qui sont couplées à des protéines régulatrices, appelées protéines G, susceptibles de fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

5 Ces récepteurs membranaires, lorsqu'ils ont fixé le ligand approprié (agoniste ou antagoniste), subissent un changement de conformation, qui induit un signal intracellulaire, qui modifie le comportement de la cellule cible.

10 Dans le cas des récepteurs β -adrénergiques, lorsqu'ils se lient avec des agonistes des catécholamines, ils catalysent l'activation d'une classe de protéines G, qui stimule à son tour l'activité de l'adénylate cyclase, alors que les antagonistes des RA β agissent en compétition
15 avec les agonistes pour la liaison au récepteur et empêchent l'activation de l'adénylate cyclase.

Lorsque l'adénylate cyclase est activée, elle catalyse la production d'un médiateur intracellulaire ou second messenger, notamment l'AMP cyclique.

20 Les Inventeurs ont récemment mis en évidence de nouveaux récepteurs β -adrénergiques chez l'Homme, dénommés RA-Hu β 3, et chez la souris (Demande Internationale WO 92/12246), dénommés RA-Mu β 3, et caractérisés par des propriétés différentes de celles des récepteurs β 1 et
25 β 2, notamment en ce qu'ils se comportent de façon différente vis-à-vis de substances respectivement antagonistes et agonistes des récepteurs β 1 et β 2 (Demande Internationale WO 90/08775).

En particulier, le récepteur RA-Hu β 3 est plus
30 particulièrement constitué par une séquence de 408 amino-acides et est considéré comme comportant sept régions transmembranaires hydrophobes séparées par des boucles hydrophiles intra- et extra-cellulaires et le récepteur RA-Mu β 3 est constitué par une séquence de 400 amino-acides
35 et comporte également 7 régions transmembranaires.

Les travaux antérieurs concernant le RA-Hu β 3 et le RA-Mu β 3 ont particulièrement montré que le récepteur β 3-adrénergique intervient dans les maladies telles que le diabète et/ou l'obésité, dans la mesure où il est exprimé dans des tissus qui jouent un rôle important dans le métabolisme (tissus adipeux, muscles squelettiques notamment).

Poursuivant ses travaux dans cette voie, l'un des Inventeurs a cherché à mettre en évidence un tel récepteur adrénergique β 3 chez les bovins (RA-Bo β 3), afin de pouvoir disposer d'un outil de régulation de la quantité de graisses chez ces animaux, notamment dans un but d'amélioration de la qualité de la viande.

La présente invention a pour objet une séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'ADNc du gène bovin codant pour le récepteur adrénergique β 3 bovin.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite séquence nucléotidique, elle comprend la séquence en nucléotides et la séquence déduite en aminoacides de formule (I) (SEQ ID n° 1) suivante :

```

CCCAGGCCAG GGAAATCGCT CCCACGCCCC GATGCCCCCG CCGCTGAGCA GGGTGAGCTG 60
GGAGACCCTT TCCCTCATTC CTTCCCGCCC CACGCGCGAC GCGGGG ATG GCT CCG 115
                                     Met Ala Pro
                                     1

TGG CCT CCT GGG AAC AGC TCT CTG ACC CCG TGG CCA GAT ATC CCC ACC 163
Trp Pro Pro Gly Asn Ser Ser Leu Thr Pro Trp Pro Asp Ile Pro Thr
      5              10              15

CTG GCA CCC AAT ACT GCC AAC GCG AGT GGG CTG CCA GGG GTG CCC TGG 211
Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Pro Trp
  20              25              30              35

GCG GTG GCG CTG GCG GGG GCG CTG TTG GCG CTA GCG GTG CTG GCC ACC 259
Ala Val Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala Thr
      40              45              50

GTG GGA GGC AAC CTG CTG GTA ATC GTG GCC ATC GCC CGG ACG CCG AGA 307
Val Gly Gly Asn Leu Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Arg Thr Pro Arg
      55              60              65

CTC CAG ACC ATG ACC AAC GTG TTC GTG ACT TCG CTG GCC ACA GCC GAC 355
Leu Gln Thr Met Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala Thr Ala Asp
  45              70              75              80

```

4

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | CTG | GTG | GTG | GGG | CTC | CTG | GTC | GTG | CCC | CCG | GGG | GCC | ACG | TTG | GCG | CTG | 403 |
| | Leu | Val | Val | Gly | Leu | Leu | Val | Val | Pro | Pro | Gly | Ala | Thr | Leu | Ala | Leu | |
| | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| 5 | ACC | GGC | CAC | TGG | CCC | CTG | GGC | GTC | ACC | GGT | TGC | GAG | CTG | TGG | ACC | TCA | 451 |
| | Thr | Gly | His | Trp | Pro | Leu | Gly | Val | Thr | Gly | Cys | Glu | Leu | Trp | Thr | Ser | |
| | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | 115 | |
| 10 | GTG | GAC | GTG | CTG | TGT | GTG | ACC | GCC | AGC | ATC | GAA | ACC | CTG | TGC | GCC | CTG | 499 |
| | Val | Asp | Val | Leu | Cys | Val | Thr | Ala | Ser | Ile | Glu | Thr | Leu | Cys | Ala | Leu | |
| | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | 130 | | |
| 15 | GCG | GTG | GAC | CGC | TAC | CTG | GCC | GTG | ACC | AAC | CCG | CTG | CGC | TAC | GCG | GCG | 547 |
| | Ala | Val | Asp | Arg | Tyr | Leu | Ala | Val | Thr | Asn | Pro | Leu | Arg | Tyr | Gly | Ala | |
| | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | 145 | | | |
| 20 | CTG | GTC | ACC | AAA | CGC | CGC | GCC | CTA | GCA | GCC | GTG | GTC | CTG | GTG | TGG | GTG | 595 |
| | Leu | Val | Thr | Lys | Arg | Arg | Ala | Leu | Ala | Ala | Val | Val | Leu | Val | Trp | Val | |
| | | | 150 | | | | 155 | | | | | | 160 | | | | |
| 25 | GTG | TCC | GCC | GCG | GTG | TCG | TTT | GCG | CCC | ATC | ATG | AGC | AAA | TGG | TGG | CGC | 643 |
| | Val | Ser | Ala | Ala | Val | Ser | Phe | Ala | Pro | Ile | Met | Ser | Lys | Trp | Trp | Arg | |
| | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| 30 | ATC | GGG | GCC | GAT | GCC | GAG | GCG | CAG | CGT | TGC | CAC | TCC | AAC | CCG | CGC | TGC | 691 |
| | Ile | Gly | Ala | Asp | Ala | Glu | Ala | Gln | Arg | Cys | His | Ser | Asn | Pro | Arg | Cys | |
| | 180 | | | | | 185 | | | | 190 | | | | | | 195 | |
| 35 | TGC | ACC | TTC | GCC | TCC | AAC | ATG | CCC | TAC | GCG | CTG | CTC | TCC | TCC | TCG | GTC | 739 |
| | Cys | Thr | Phe | Ala | Ser | Asn | Met | Pro | Tyr | Ala | Leu | Leu | Ser | Ser | Ser | Val | |
| | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | | |
| 40 | TCG | TTC | TAT | CTT | CCG | CTC | CTG | GTG | ATG | CTC | TTC | GTC | TAC | GCA | CGA | GTT | 787 |
| | Ser | Phe | Tyr | Leu | Pro | Leu | Leu | Val | Met | Leu | Phe | Val | Tyr | Ala | Arg | Val | |
| | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | | | |
| 45 | TTC | GTG | GTG | GCC | ACG | CGC | CAG | CTG | CGC | TTG | CTG | CGC | CGG | GAG | CTG | GCT | 835 |
| | Phe | Val | Val | Ala | Thr | Arg | Gln | Leu | Arg | Leu | Leu | Arg | Arg | Glu | Leu | Gly | |
| | | | 230 | | | | 235 | | | | | | 240 | | | | |
| 50 | CGC | TTC | CCG | CCA | GAG | GAG | TCT | CCG | CCG | GCT | CCT | TCT | CGC | TCC | GGA | TCC | 883 |
| | Arg | Phe | Pro | Pro | Glu | Glu | Ser | Pro | Pro | Ala | Pro | Ser | Arg | Ser | Gly | Ser | |
| | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| 55 | CCT | GGC | CTG | GCG | GGG | CCG | TGC | GCC | TCG | CCC | GCG | GGG | GTG | CCC | TCC | TAC | 931 |
| | Pro | Gly | Leu | Ala | Gly | Pro | Cys | Ala | Ser | Pro | Ala | Gly | Val | Pro | Ser | Tyr | |
| | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | 275 | |
| 60 | GGC | CGG | CGG | CCG | GCG | CGC | CTT | CTG | CCT | CTG | CGG | GAA | CAC | CGC | GCC | CTG | 979 |
| | Gly | Arg | Arg | Pro | Ala | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Arg | Glu | His | Arg | Ala | Leu | |
| | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | 290 | | |
| 65 | CGC | ACC | TTG | GGG | CTC | ATC | ATG | GGA | ACC | TTC | ACT | CTC | TGC | TGG | TTG | CCT | 1027 |
| | Arg | Thr | Leu | Gly | Leu | Ile | Met | Gly | Thr | Phe | Thr | Leu | Cys | Trp | Leu | Pro | |
| | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | 305 | | | |
| 70 | TTC | TTT | GTG | GTC | AAC | GTG | GTG | CGC | GCC | CTC | GGG | GGC | CCC | TCT | CTG | GTG | 1075 |
| | Phe | Phe | Val | Val | Asn | Val | Val | Arg | Ala | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Leu | Val | |
| | | | 310 | | | | 315 | | | | | | 320 | | | | |
| 75 | TCC | GGC | CCC | ACT | TTC | CTC | GCC | CTT | AAC | TGG | CTG | GGC | TAT | GCC | AAC | TCT | 1123 |
| | Ser | Gly | Pro | Thr | Phe | Leu | Ala | Leu | Asn | Trp | Leu | Gly | Tyr | Ala | Asn | Ser | |
| | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | |

5

```

GCC TTC AAC CCG CTC ATC TAC TGC CGC AGC CCG GAC TTT CGG AGC GCC 1171
Ala Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ser Ala
340                               345                               350                               355

5  TTC CGC CGC CTG CTG TGT CGC TGC CGG CCG GAG GAG CAC CTC GCC GCT 1219
Phe Arg Arg Leu Leu Cys Arg Cys Arg Pro Glu Glu His Leu Ala Ala
                               360                               365                               370

10  GCC TCC CCG CCC CGA GCC CCC TCC GGC GCC CCC ACG GCC CTG ACC AGC 1267
Ala Ser Pro Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Pro Thr Ala Leu Thr Ser
                               375                               380                               385

15  CCC GCT GGC CCC ATG CAG CCC CCA GAG CTC GAC GGG GCT TCC TGC GGA 1315
Pro Ala Gly Pro Met Gln Pro Pro Glu Leu Asp Gly Ala Ser Cys Gly
                               390                               395                               400

CTT TCT TAGGCCTTGA AGAAACAAC CCATTGATCC GGAACCTTTG GAAAGCCTCT 1371
Leu Ser
405

20  GGCCGGCCTC GGTTTCAGAAT GAGCCCCGTG GAGTTTCCCA GCTGGAAAAC TCTGCCCTCC 1431
CCAGCCTGAC GACTGGGTCC TGGGAGGAGG CGCGGGGGCT GACTGGGGAG GGGAAATCCT 1491

25  TACCAAGTGG GTTTTCGCAC TCTTTCTGAG AGAAGTTTTC TACACCCAG CCCTGAACTT 1551
CACCGCTGCC TCAGCAGCTC CCGCGTCTGG TTCCCATGC CCAGGTGCCC GGGCAGGAGC 1611
TGGGCTGCGT TTAGCCCCGG GACCCGCACC TGTCCTACTC GGGTGCTGTG TGCGCAGGGG 1671

30  CAAGGCGGGC ACCTTCATTC TGTTCTTCT GCGCCCAGA CCCTGAGGAA CCCACCGGGG 1731
TGCTGGAGGC CCAGGCTGAG AAGAGGAAGG TGGGAAGGT CACGGTTTGG GCTTCTGTCC 1791

35  CTGGCTTCCT CACTGTAGAC ACACCTACCT CACAGCATTT TCAGGACTTT ACTTTAGCCT 1851
TTGGGGTGGG GGTGGGGGGG CGCTCCTGGT TTCTGGGAA GGTGAACCAT TAGAATGGGT 1911

40  CCCTTTTCCT TTTGAAATCA AATTAATAAA TGTTACTGAA TGCAGTTTAA AAAAAAAAAA 1971
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2000

```

(I)

45 Dans cette séquence, l'ATG souligné qui se trouve en position 107, correspond probablement au codon d'initiation de la synthèse protéique.

50 Il existe 85 % d'homologie entre les séquences nucléotidiques bovine et humaine codant pour le récepteur adrénergique $\beta 3$ et il existe 76 % d'homologie entre les séquences nucléotidiques bovine et murine codant pour le récepteur adrénergique $\beta 3$.

Ladite séquence comprend notamment les sites de restriction uniques suivants :

~~Bpu1102 I, Fok I, EcoR V, Bcg I, Nhe I, BspM I, Afl III, Age I, BstE II, BspH I, Bsg I, Nsp I,~~

Nsp7524 I, NspC I, Sap I, BamH I, BstY I, Asc I, Sty I, Hinc II, Apa I, Bsp120 I, Bbe I, Ehe I, Kas I, Nar I, Ecl136 I, Sac I, Stu I, Fse I, Drd I, Tth111 I, Srf I, Bsu36 I, Sfc I, BstX I, Ase I, Bsm I, Dra I.

5 L'invention a également pour objet les fragments de ladite séquence, utiles pour l'expression du peptide correspondant et/ou la détection du gène bovin codant pour le récepteur adrénergique $\beta 3$ bovin.

Parmi lesdits fragments, on peut citer :

- 10 - le fragment de 78 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 218-295 de la séquence de formule I, et qui code pour la région transmembranaire TM1,
- le fragment de 72 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 332-403 de la séquence de formule
- 15 I, et qui code pour la région transmembranaire TM2,
- le fragment de 66 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 434-499 de la séquence de formule I, et qui code pour la région transmembranaire TM3,
- le fragment de 69 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 572-640 de la séquence de formule
- 20 I, et qui code pour la région transmembranaire TM4,
- le fragment de 72 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 713-784 de la séquence de formule I, et qui code pour la région transmembranaire TM5,
- 25 - le fragment de 66 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 983-1048 de la séquence de formule I, et qui code pour la région transmembranaire TM6,
- le fragment de 78 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 1070-1147 de la séquence de formule I, et qui code pour la région transmembranaire TM7.
- 30

La présente invention a également pour objet des clones d'ADNc, caractérisés en ce qu'ils comprennent un fragment de séquence codant pour le récepteur $\beta 3$ bovin (RA-Bo $\beta 3$).

35 Conformément à l'invention, le clone dénommé M13-6.6 comprend 2979 paires de bases, inclut la séquence

de formule I et comprend les sites de restriction uniques suivants : EcoR V, Bcg I, Nhe I, BstE II, BspH I, Bsg I, Sap I, BamH I, Asc I, Stu I, Fse I, Drd I, Srf I, Sfc I, Ase I, Bsm I, Dra I, Bsp1407 I, Csp6 I, Rsa I, Ssp I, 5 Dra III, Bgl II, Afl II, Spe I, Tfi I, Hpa I, Nde I, EcoN I, BsaB I, Pvu I.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique telle que 10 définie ci-dessus, ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

Lesdites sondes nucléotidiques sont caractérisées en ce qu'elles s'hybrident avec les séquences 15 nucléotidiques telles que définies ci-dessus mais ne s'hybrident pas avec les gènes codant pour les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, ni avec l'ARN messenger desdits récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques.

Selon un mode de réalisation avantageux de la 20 dite sonde, sa séquence est homologue ou complémentaire de celle d'un segment d'au moins 10 pb de la séquence I.

Au sens de la présente invention, "séquence homologue" englobe non seulement les séquences identiques à la séquence I, ou à un fragment de celle-ci, mais également 25 celles n'en différant que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de nucléotides, à condition que les séquences ainsi modifiées aient une spécificité d'hybridation équivalente à celle de la séquence (I) ou du segment non modifié considéré.

30 De même, on entend par "séquence complémentaire", non seulement les séquences strictement complémentaires de la séquence (I) ou de ses segments, mais également des séquences modifiées, comme indiqué précédemment, possédant une spécificité d'hybridation équivalente 35 à celle desdites séquences strictement complémentaires.

Les conditions d'hybridation sont définies comme suit :

Pour les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à environ 100 nucléotides, les conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes :

750 mM de NaCl, 75 mM de Tris-sodium citrate, 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 50 mM de phosphate de sodium, 1 mM de pyrophosphate de sodium, 100 µM d'ATP, 10 à 25 % de formamide, 1 % Ficoll ("PHARMACIA" poids moléculaire moyen de 400,00), 1 % de polyvinylpyrrolidone, 1 % de sérum albumine bovine, pendant 14 à 16 h à 42°C.

Pour les sondes les plus longues, c'est-à-dire présentant plus d'environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont celles indiquées précédemment pour les sondes les plus courtes, mais dans lesquelles le milieu sus-défini contient 40 % de formamide au lieu de 10 à 25 % de formamide.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite sonde peut être avantageusement définie par l'une quelconque des séquences nucléotidiques ci-dessus et notamment par le fragment de 2 kbases, qui correspond à la totalité de la séquence de formule I.

La présente invention a également pour objet un peptide et/ou un fragment de peptide, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus et en ce qu'il présente une activité de récepteur β 3-adrénergique.

Une activité de récepteur β 3-adrénergique est celle définie dans la Demande de Brevet français n° 89 00918, à savoir que, lorsque le fragment est exposé à la surface d'une cellule, il est capable de participer à l'activation de l'adénylate cyclase en présence d'un des agonistes suivants : BRL 28410, BRL 37344, CGP 12177A, (1)-isoprotérénol et carazolol ; soit il est susceptible d'être reconnu par des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur adrénergique β 1, ni le récepteur adrénergique

$\beta 2$; soit il est susceptible de générer des anticorps qui ne reconnaissent ni le récepteur $\beta 1$, ni le récepteur $\beta 2$.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide, il comprend 405 amino-acides et présente la sé-
 5 quence en amino-acides de formule II (SEQ ID n° 2) sui-
 vante :

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-------|------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-------|-----|-----|--|
| | Met | Ala | Pro | Trp | Pro | Pro | Gly | Asn | Ser | Ser | Leu | Thr | Pro | Trp | Pro | Asp | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 10 | Ile | Pro | Thr | Leu | Ala | Pro | Asn | Thr | Ala | Asn | Ala | Ser | Gly | Leu | Pro | Gly | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | Val | Pro | Trp | Ala | Val | Ala | Leu | Ala | Gly | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu | Ala | Val | |
| | | | 35 | | | → TM1 | 40 | | | | | | 45 | | | | |
| 15 | Leu | Ala | Thr | Val | Gly | Gly | Asn | Leu | Leu | Val | Ile | Val | Ala | Ile | Ala | Arg | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | TM1 ← | | | |
| 20 | Thr | Pro | Arg | Leu | Gln | Thr | Met | Thr | Asn | Val | Phe | Val | Thr | Ser | Leu | Ala | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | → TM2 | | | | 80 | |
| | Thr | Ala | Asp | Leu | Val | Val | Gly | Leu | Leu | Val | Val | Pro | Pro | Gly | Ala | Thr | |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 25 | Leu | Ala | Leu | Thr | Gly | His | Trp | Pro | Leu | Gly | Val | Thr | Gly | Cys | Glu | Leu | |
| | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | → TM3 | | | |
| | Trp | Thr | Ser | Val | Asp | Val | Leu | Cys | Val | Thr | Ala | Ser | Ile | Glu | Thr | Leu | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| 30 | Cys | Ala | Leu | Ala | Val | Asp | Arg | Tyr | Leu | Ala | Val | Thr | Asn | Pro | Leu | Arg | |
| | | 130 | TM3← | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| | Tyr | Gly | Ala | Leu | Val | Thr | Lys | Arg | Arg | Ala | Leu | Ala | Ala | Val | Val | Leu | |
| 35 | | 145 | | | | 150 | | | | | 155 | → TM4 | | | | 160 | |
| | Val | Trp | Val | Val | Ser | Ala | Ala | Val | Ser | Phe | Ala | Pro | Ile | Met | Ser | Lys | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| 40 | Trp | Trp | Arg | Ile | Gly | Ala | Asp | Ala | Glu | Ala | Gln | Arg | Cys | His | Ser | Asn | |
| | | TM4 ← | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| | Pro | Arg | Cys | Cys | Thr | Phe | Ala | Ser | Asn | Met | Pro | Tyr | Ala | Leu | Leu | Ser | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | → TM5 | | 205 | | | | |
| 45 | Ser | Ser | Val | Ser | Phe | Tyr | Leu | Pro | Leu | Leu | Val | Met | Leu | Phe | Val | Tyr | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | Ala | Arg | Val | Phe | Val | Val | Ala | Thr | Arg | Gln | Leu | Arg | Leu | Leu | Arg | Arg | |
| 50 | | 225 | TM5← | | | | 230 | | | | 235 | | | | | 240 | |
| | Glu | Leu | Gly | Arg | Phe | Pro | Pro | Glu | Glu | Ser | Pro | Pro | Ala | Pro | Ser | Arg | |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| 55 | Ser | Gly | Ser | Pro | Gly | Leu | Ala | Gly | Pro | Cys | Ala | Ser | Pro | Ala | Gly | Val | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | Pro | Ser | Tyr | Gly | Arg | Arg | Pro | Ala | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu | Arg | Glu | His | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | | 285 | | | |

10

Arg Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys
 290 →TM6 295 300

5 Trp Leu Pro Phe Phe Val Val Asn Val Val Arg Ala Leu Gly Gly Pro
 305 310 TM6← 315 320

Ser Leu Val Ser Gly Pro Thr Phe Leu Ala Leu Asn Trp Leu Gly Tyr
 →TM7 325 330 335

10 Ala Asn Ser Ala Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe
 340 345 TM7← 350

15 Arg Ser Ala Phe Arg Arg Leu Leu Cys Arg Cys Arg Pro Glu Glu His
 355 360 365

Leu Ala Ala Ala Ser Pro Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Pro Thr Ala
 370 375 380

20 Leu Thr Ser Pro Ala Gly Pro Met Gln Pro Pro Glu Leu Asp Gly Ala
 385 390 395 400

Ser Cys Gly Leu Ser
 405

25

(II)

Ce peptide est dénommé ci-après récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin (RA-Bo $\beta 3$).

L'invention comprend également les peptides
 variants de ceux définis ci-dessus, qui comportent cer-
 30 taines mutations, sans que les peptides ne perdent les
 propriétés de récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

Parmi ces variants, on peut mentionner ceux
 qui sont reconnus par des anticorps reconnaissant les
 régions transmembranaires, ainsi que ceux qui sont recon-
 35 nus par des anticorps reconnaissant les régions autres que
 les régions transmembranaires.

La présente invention a également pour objet
 des fragments ou des combinaisons de fragments du RA-Bo $\beta 3$,
 conforme à l'invention, et notamment :

40

- un fragment de 26 amino-acides, correspon-
 dant au segment 38-63 de la formule II et constituant la
 région transmembranaire TM1,

45

- un fragment de 24 amino-acides, correspon-
 dant au segment 76-99 de la formule II et constituant la
 région transmembranaire TM2,

- un fragment de 22 amino-acides, correspondant au segment 110-131 de la formule II et constituant la région transmembranaire TM3,

5 - un fragment de 23 amino-acides, correspondant au segment 156-178 de la formule II et constituant la région transmembranaire TM4,

- un fragment de 24 amino-acides, correspondant au segment 203-226 de la formule II et constituant la région transmembranaire TM5,

10 - un fragment de 25 amino-acides, correspondant au segment 293-314 de la formule II et constituant la région transmembranaire TM6,

- un fragment de 26 amino-acides, correspondant au segment 322-347 de la formule II et constituant la
15 région transmembranaire TM7.

Lesdits fragments peuvent avantageusement être obtenus par synthèse, notamment par la méthode de Merrifield.

La présente invention a également pour objet
20 un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

On entend, au sens de la présente invention, par vecteur recombinant, aussi bien un plasmide, un cos-
25 mide, qu'un phage.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, il est constitué par un vecteur recombinant approprié, comprenant en particulier une origine de réplique dans un microorganisme hôte approprié, notamment
30 une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçues ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur permettant l'expression des gènes dans lesdites bac-
35 téries ou cellules eucaryotes, et dans lequel est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence tels

que définis ci-dessus, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un peptide, d'un fragment de peptide ou d'une combinaison de fragments de peptide ayant une activité de récepteur $\beta 3$ adrénergique bovin.

5 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit vecteur est constitué d'un vecteur d'expression pRc/CMV dans lequel est inséré, au niveau du lieu multisi-
10 te, au moins le fragment codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin ; un tel plasmide a été dénommé pRc/CMV-Bo $\beta 3$ -ADR, et a été déposé auprès de la
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 15 avril 1993 sous le n° I-1297.

15 La présente invention a également pour objet une cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression conforme à l'invention.

20 Une telle cellule est capable d'exprimer un peptide, d'origine bovine, ayant une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

 Selon un mode de réalisation avantageux, la cellule hôte est notamment constituée par les cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary).

25 Un autre des microorganismes utilisés peut être constitué par une bactérie, notamment *Escherichia coli*.

30 Il n'était pas évident que les bovins aient des récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques, dont l'activation permet, de manière inattendue, de réguler la quantité et la qualité des graisses, ce qui permet d'améliorer la qualité de la viande bovine.

35 De manière avantageuse, les récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques bovins conformes à l'invention constituent un outil pour la sélection de ligands intervenant dans l'activation de ces récepteurs et permettent d'identifier et de sélectionner des ligands β -adrénergiques spécifiques

des récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques et en particulier des ligands plus affins et plus sélectifs pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin que pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique humain.

5 Conformément à l'invention, le procédé de sélection et d'identification de substances capables de se comporter comme ligand spécifique vis-à-vis d'un peptide (récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin) conforme à l'invention comprend :

10 - la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, laquelle cellule hôte exprime ledit peptide bovin (récepteur adrénergique $\beta 3$ bovin), le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, et laquelle mise en contact est réalisée
15 dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance s'il y a lieu, et

- la détection de la formation éventuelle d'un
20 complexe du type ligand-peptide.

Un tel procédé permet la sélection, soit de ligands spécifiques du récepteur $\beta 3$ -adrénergique, soit de ligands spécifiques du récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin exclusivement.

25 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1a représente la carte de restriction
30 du fragment codant de 2 000 pb, qui correspond à la formule I ;

- la figure 1b représente la carte de restriction du clone 6.6 qui contient le gène $\beta 3$ -adrénergique bovin et comprend 3 kb, en tout ;

35 - la figure 2 est une comparaison des récepteurs $\beta 3$ humain, murin (souris et rat) et bovin ;

- la figure 3 représente une comparaison des séquences codantes pour le RA-Hu β 3 et le RA- β 3 bovin ;

- la figure 4 représente le vecteur d'expression pRc/CMV-Bo β 3-ADR ;

5 - la figure 5 représente le vecteur d'expression pRc/CMV incluant un lieu multisite comprenant les sites uniques de restriction suivants : Hind III, BstX I, Not I, Xba I et Apa I.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces
10 exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Isolement et identification du gène β 3-adrénergique bovin.

15 - Préparation d'ARN :

Le gène β 3-adrénergique bovin a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de tissu adipeux brun de veau, construite dans le bactériophage λ gt11.

Pour ce faire, les ARN totaux sont extraits de
20 tissu adipeux brun de veau, par la méthode utilisant le thiocyanate de guanidinium, puis on purifie les ARN messagers poly A+ à l'aide de colonnes oligo(dT) (Pharmacia réf.: 27-9258-01).

Les ARN totaux et les ARN messagers ont été
25 analysés en Northern blot pour vérifier la présence et la taille des messagers du gène recherché. Après électrophorèse, l'ARN a été transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Amersham Hybond® N+ réf. RPN 203B). Cette membrane est ensuite hybridée avec une sonde radio-
30 marquée (radiomarquage voir criblage des phages recombinants, ci-après), constituée par un fragment d'ADN de 2900 paires de bases contenant la totalité du gène β 3-adrénergique murin précédemment isolé dans le laboratoire (NAHMIAS et al., 1991, EMBO J., 10, 3721-3727 ; Demande
35 Internationale WO 92/12246). Après hybridation avec la sonde radiomarquée, les filters sont lavés et exposés pen-

dant plusieurs jours sur film d'autoradiographie (KODAK X-OMAT AR), on observe un fragment d'environ 2,0 kilobases, aussi bien dans la fraction d'ARN totaux que dans la fraction des ARN messagers purifiés. Ceci confirme que le gène
5 correspondant au récepteur β 3-adrénergique est exprimé dans le tissu adipeux brun de veau et que l'on peut construire la banque d'ADNc à partir de ces ARN messagers poly A+ purifiés.

Pour vérifier que la source d'ARN est bien du
10 tissu adipeux brun, le Northern blot obtenu ci-dessus a été hybridé avec une sonde radiomarquée correspondant au gène de la protéine découplante humaine (hUCP). Cette protéine est seulement présente dans ce type de tissu adipeux, et peut être considérée comme une sorte de
15 "marqueur" du tissu adipeux brun. Avec cette sonde, un signal fortement positif est décelé.

- Synthèse d'ADNc :

On synthétise ensuite l'ADNc correspondant, en prenant comme matrice les ARN messagers poly A+ purifiés,
20 et comme amorce pour la synthèse du premier brin un primer oligo(dT)₁₅ provenant du kit "RiboClone cDNA synthesis system" (Promega réf. C 2100). La synthèse du premier brin d'ADNc se fait en présence d'AMV reverse transcriptase, et la synthèse du deuxième brin est réalisée à l'aide de deux
25 enzymes agissant simultanément (*E. coli* polymérase I et *E. coli* RNase H). Ensuite l'ADNc double brin est traité par la T4 DNA polymérase, afin d'obtenir des bouts francs. Le kit Promega C 2100 est utilisé pour l'ensemble de ces réactions.

30 Ensuite, des adaptateurs comportant des sites EcoRI sont ajoutés, afin de pouvoir insérer l'ADNc obtenu dans le bactériophage λ gt11, dans les conditions suivantes, décrites dans le kit EcoR I Adaptor Ligation System I (Promega, réf.: C 1900) :

35 l'ADNc est centrifugé à travers une matrice Sephacryl[®] S-400 (kit) pour éliminer les molécules de pe-

tite taille ; puis les adaptateurs sont ajoutés à l'ADNc par ligature, en présence de T4 ADN ligase, pendant une nuit et une deuxième centrifugation est effectuée à travers une colonne Sephacryl® S-400, de manière à éliminer
5 les adaptateurs non fixés.

Avant d'insérer l'ADNc ainsi traité dans le vecteur λ gt11, on phosphoryle les adaptateurs, en présence de T4 polynucléotide kinase.

- Insertion de l'ADNc dans le bactériophage

10 λ gt11 :

Le bactériophage λ gt11, utilisé comme vecteur, provient du kit "Protoclone Lambda gt11 System" (Promega réf. T 301/0-2). L'ADN du phage est digéré par EcoRI et déphosphorylé. La déphosphorylation empêche le vecteur de
15 se refermer sur lui-même.

On effectue plusieurs ligations avec des quantités variables de l'ADNc obtenu, avec 0,5 μ g d'ADN de vecteur, dans les conditions suivantes, pour chaque ligation : pendant 3 heures à température ambiante, en présence de T4 ADN ligase (kit Promega C1900).
20

On procède ensuite à une encapsidation *in vitro*, à l'aide des extraits "Packagene" présents dans le kit Promega T301/0-2.

Après une incubation à 22°C, durant 2 heures,
25 les particules de phages reconstituées sont utilisées pour infecter des bactéries, notamment la souche Y1090(r-) (Genotype : Δ (lacU169), proA+, Δ (lon), araD139, strA, supF, (trpC22::Tn10), (pMC9), hsd(r-, m+)), dans les conditions suivantes : on dilue très fortement (1/1 000 ou
30 1/10 000) les phages encapsidés ; chaque dilution de phages est incubée avec des cellules Y1090(r-) à 37°C, durant 30 minutes, et ensuite, ces bactéries infectées sont étalées sur un milieu nutritif (LB agar) contenu dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées une nuit à
35 37°C, et le lendemain, on observe des plages de lyse, chaque plage correspond à un phage recombinant. En comp-

tant les nombres de plages de lyse et en multipliant avec le facteur de dilution donné, le titre de la banque d'ADNc est déterminé et est d'environ 4 millions de phages recombinants. Le bruit de fond du vecteur seul sans insert est de 3,5 %, ce qui est tout à fait acceptable.

- Criblage des phages recombinants :

En se basant sur les résultats obtenus, environ 200 000 phages ont été étalés sur boîte de Pétri (milieu LB agar), afin de pouvoir les cribler avec une sonde radiomarquée, dans les conditions suivantes :

- souche bactérienne utilisée : LE 392 (Genotype : F-, hsdR 574 (r-, m+), supE44, supF58, lacY1 or Δ (lacIZY)6, galk2, galT22, metB1, trpR55, λ -).

- sonde : fragment d'ADN de 2900 paires de bases (gène β 3-adrénergique murin), tel que précisé ci-dessus pour le Northern Blot, radiomarcué par Random priming (Kit Boehringer réf. 1004 760), en incorporant 50 μ Ci de dATP (α^{32} P) et 50 μ Ci de dCTP (α^{32} P) (références Amersham : PB 10204 et PB 10205).

Après transfert de l'ADN des plages de lyse sur des membranes Hybond® N+ (Amersham réf. RPN 132B), ces dernières sont hybridées avec la sonde radiomarquée, puis lavées et exposées une nuit sur film d'autoradiographie.

17 signaux d'hybridation ont été observés, dont 11 se sont, par la suite, révélés être des faux positifs. Les 6 clones restant (1, 3, 5, 6, 8 et 9) ont été purifiés par quatre isolements successifs, suivis d'une hybridation avec la sonde β 3-adrénergique murine décrite ci-dessus.

- Analyse des clones positifs :

Pour identifier le(s) clone(s) contenant le gène β 3-adrénergique bovin en entier, c'est-à-dire l'ADNc correspondant à la région codante pour toute la protéine,

2 méthodes ont été utilisées : l'amplification par PCR et la coupure par une endonucléase de restriction, avec le

but de trouver parmi les clones positifs celui qui comporte l'insert le plus grand.

1) L'amplification par PCR a été faite sur lysat de phages (particules de phages encapsidées) à l'aide des deux amorces suivantes :

1218 : amorce λ gt11 (brin sens) de 24 mers, de formule : 5' d(GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)3', et

1222 : amorce λ gt11 (brin anti-sens) de 24 mers également, de formule : 5' d(TTGACACCAGACCAACTGGTAATG)3' (New England Biolabs).

Etant donné que ces amorces s'hybrident de part et d'autre du site d'insertion de l'ADNc dans le phage, il a été possible de connaître ainsi la taille des fragments insérés dans les différents clones positifs.

2) L'ADN des 6 phages intéressants a été préparé et coupé par l'enzyme de restriction EcoRI, afin de vérifier la taille des inserts ; l'hybridation avec la sonde β 3-adrénergique murine a permis de déceler le clone comportant le plus grand insert positif.

Issu de ces deux approches, le clone n° 6 a été choisi pour une analyse plus poussée étant donnée qu'il comporte le plus grand insert d'ADNc recherché (3 kilobases).

Après coupure du phage λ par l'enzyme de restriction EcoR I, le fragment comportant l'ADNc a été inséré dans le bactériophage M13 tg 131 afin de pouvoir séquencer le gène.

EXEMPLE 2 : Séquençage du gène β 3-adrénergique bovin.

On a séquencé le fragment d'ADN d'environ 3 kb délimité par les sites de l'enzyme EcoR I.

Ce fragment d'ADN a été purifié à partir de l'ADN du clone 6 et sous-cloné dans le site EcoR I du vecteur M13tg131. Les clones M13 ayant intégrés le fragment d'ADN dans les 2 orientations opposées (6.3 et 6.6) ont été identifiés et séquencés.

Pour effectuer les réactions de séquençage, le kit USB Sequenase Version 2.0 (United States Biochemical réf.: 70770) a été utilisé.

La séquence a été réalisée en utilisant des
5 amorces spécifiques, qui s'hybrident sur le brin sens (clone M13-6.6) ou sur le brin anti-sens (clone M13-6.3), conformément à la méthode de Sanger (MANIATIS et al., *Molecular Cloning*, 2ème édition, pages 13.3-13.10).

Les résultats obtenus, à partir de la séquence
10 du fragment EcoR I de 3 kilobases, montrent la séquence nucléotidique du RA β 3 bovin (1215 pb) et des régions non codantes (106 pb en 5' et 638 pb en 3') (formule I). Les sites de restriction contenus dans le fragment de 2 000 pb sont positionnés sur la figure 1a (bov 6.6 court(pA)).

15 La figure 1b montre les sites de restriction uniques contenus dans le fragment de 3 kb qui a été séquencé.

La comparaison des régions codantes des gènes β 3 humain et bovin (figure 3), indique une forte homologie
20 (85 % au niveau des séquences nucléotidiques entre RA bovin et humain) ; la comparaison des régions codants des gènes β 3 bovin et murin montre également une forte homologie (76 % au niveau des séquences nucléotidiques entre RA bovin et RA murin).

25 Le gène β 3 bovin code pour le peptide de 405 aminoacides, qui présente une très grande homologie avec le peptide β 3 humain ou le peptide β 3 murin (figure 2), comme indiqué plus haut.

EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur pour l'expression du
30 **RA- β 3 bovin.**

La carte de restriction du fragment de 2 kb qui a été séquencé (figure 1a) indique la présence d'un site de coupure par l'enzyme Srf I à la position 1598, soit 270 nucléotides en aval de la région codante du gène

35 β 3 de boeuf. L'ADN du clone M13-6.6 a été digéré avec les enzymes EcoR I et Srf I pour libérer le fragment de

1598 paires de bases contenant la région codante du gène $\beta 3$ bovin et une partie de la région 3' non traduite. Ce fragment d'ADN a été purifié, puis inséré dans le vecteur d'expression pRc/CMV, aux sites de coupure Hind III et Xba I (figure 5).

Comme les extrémités générées par les enzymes Hind III et Xba I d'une part et EcoR I et Srf I d'autre part, ne sont pas compatibles, on a pris soin de traiter les extrémités EcoR I et Srf I de l'insert d'une part avec le fragment Klenow de la polymérase I, et les extrémités Hind III et Xba I du vecteur d'autre part, avec le fragment Klenow de la polymérase I, de façon à obtenir des bouts francs (MANIATIS et al., *Molecular Cloning*, 2ème édition, pages 5.40-5.42).

On a ainsi obtenu le plasmide recombinant pRc/CMV-Bo $\beta 3$ -ADR, représenté sur la figure 4.

EXEMPLE 4 : Propriétés pharmacologiques du produit d'expression du gène $\beta 3$ bovin.

a) Transfection de cellules CHO-K1

Pour mieux caractériser le récepteur adrénergique $\beta 3$ bovin, on exprime le gène $\beta 3$ bovin à la surface de cellules eucaryotes, qui possèdent tous les éléments nécessaires à la transduction du signal.

Le plasmide recombinant pRc/CMV de l'exemple 3 a été transfecté dans des cellules CHO-K1 par une méthode de transfection à la lypofectine ; les cellules transfectées sont sélectionnées avec de la généticine (G418) (dérivé de la néomycine).

De manière plus précise, ladite méthode de transfection est réalisée comme suit :

Les cellules CHO-K1 (ATCC CCL 61) sont cultivées à confluence dans un milieu de culture contenant : du milieu DMEM à 45 %, du milieu F12-Ham à 45 %, du sérum de veau foetal inactivé à la chaleur à 10 %, de la glutamine 2 mM, de la pénicilline 100 U/ml et de la streptomycine 100 μ g/ml.

1 µg d'ADN du plasmide pRc/CMV β3 bovin est mélangé avec 5 µl de lipofectine (GIBCO) et 1 000 µl du milieu de culture précité, dépourvu de sérum.

On ajoute ce mélange à des cellules en culture, que l'on laisse incuber à 37°C, pendant 5 heures.

Le milieu est remplacé avec un milieu de culture précité, contenant du sérum et les cellules sont à nouveau incubées à 37°C, pendant 48 heures. Les cellules sont alors réparties dans 96 puits selon des dilutions variables et incubées en présence de généticine (G418, Gibco) à 400 µg/ml, dans un milieu complet, pendant environ 10 jours, le milieu étant changé tous les deux jours.

Les différentes colonies obtenues sont ensuite sous-clonées, d'abord dans 48 puits, puis dans 6 puits, avant le criblage.

Les colonies stables sont criblées pour leur capacité à lier de manière spécifique l' [¹²⁵I]-cyanopindolol et également pour leur capacité à stimuler l'adénylate cyclase, en présence d'isoprotérénol, conformément au protocole décrit dans TATE et al., Eur. J. Biochem., 1991, 196, 357-361.

Les cellules transfectées et exprimant de façon stable le RAβ3, lient le [¹²⁵I]-cyanopindolol, avec une affinité équivalente à celle des RAβ3 correspondants chez l'Homme ou chez la Souris, également obtenus par clonage.

On a sélectionné, à partir des clones stables, un ensemble de sous-clones ; l'un d'entre eux, dénommé 62-26, a été utilisé pour l'évaluation pharmacologique du RAβ3 bovin.

b) Caractéristiques pharmacologiques du récepteur RAβ3 bovin

La caractérisation pharmacologique du récepteur RAβ3 bovin a été réalisée en utilisant le clone stable 62-26. Les propriétés pharmacologiques de 10 ligands β3-adrénergiques ont été déterminées par des

études de stimulation de l'adénylate cyclase et de liaison du [125 I]-cyanopindolol.

Les expériences d'activation de l'adénylate cyclase ont été réalisées suivant le protocole détaillé dans BLIN et al., Mol. Pharmacol., 1991, 44, 1094-1104.

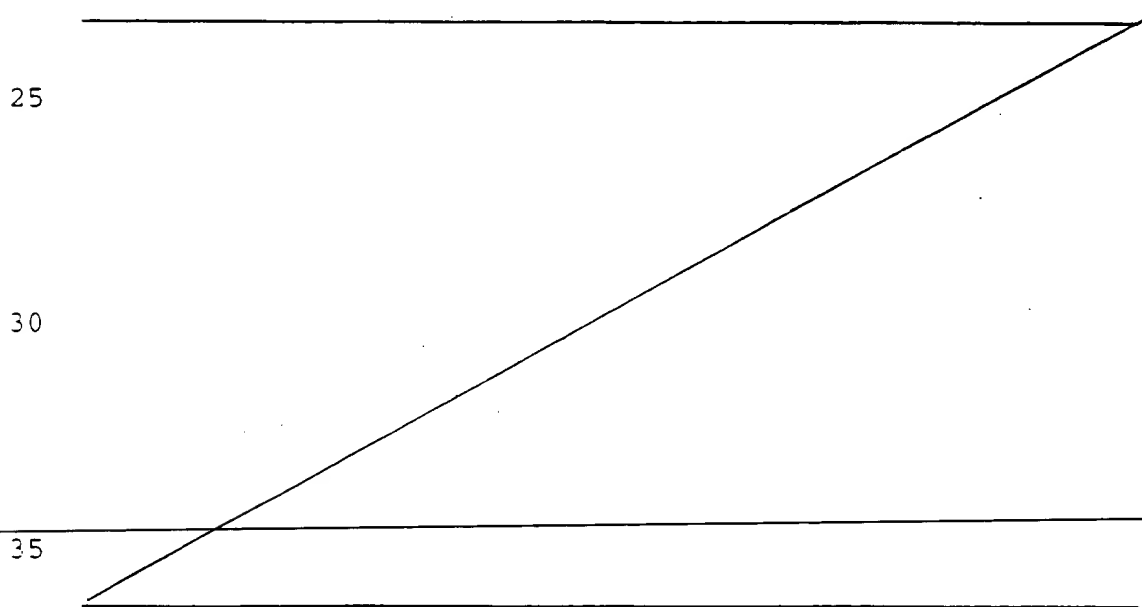
Brièvement, les cellules préconfluentes en plaques six puits ($0,6 \times 10^6$ cellules/puits) sont mises en présence, ou non, de doses croissantes de ligands pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par lavage en PBS à 4°C et addition de 500 μ l de NaOH 1N. Après centrifugation et neutralisation avec de l'acide acétique 1N, les lysats cellulaires sont récupérés et la quantité totale d'AMPc accumulé est déterminée à l'aide d'un kit de dosage commercial.

L'étude de la liaison des ligands en compétition a été réalisée sur cellules intactes suivant le protocole détaillé dans BLIN et al., Mol. Pharmacol., 1991, 44, 1094-1104. Brièvement, 10^5 cellules sont incubées avec 0,5 nM d' [125 I]-cyanopindolol en présence ou en absence de concentrations croissantes de compétiteurs, pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par dilution avec du PBS glacé, les cellules sont filtrées et la radioactivité est mesurée dans un compteur gamma. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel Graph-Pad®.

Parmi les ligands testés, quatre sont décrits comme agonistes des récepteurs β_1 , β_2 , β_3 -RA : (-)isoprotérénol, (-)épinéphrine, (-)norépinéphrine, BRL 37344 ; trois sont décrits comme spécifiques du récepteur RA β_3 (β_1 -, β_2 -RA antagonistes) : CGP12177A, ICI201651, bucindolol. Le bupranolol a été également testé car décrit comme antagoniste des trois sous types de récepteur (BLIN et al., Br. J. Pharmacol., 1994, sous presse). Enfin, on a testé le (-)propranolol décrit comme agoniste partiel du récepteur RA β_3 humain et antagoniste du récepteur RA β_3 de souris (NAHMIAS et al., EMBO J., 1991, 10, 3721-3727).

Les valeurs des constantes d'activation de l'adénylate cyclase (K_{act}), des constantes d'inhibition (K_i) et de l'activité intrinsèque (AI) correspondant au rapport effet du ligand à 10^{-4} M/effet de l'isoprotérénol à 10^{-4} M, obtenus pour les différents ligands sont présentés dans le Tableau ci-après. Les quatres ligands agonistes des trois sous types de récepteurs (β_1 , β_2 , β_3 -RA) ont des valeurs de K_{act} et de K_i voisines de celles obtenues pour le récepteur RA β_3 humain (BLIN et al., Br. J. Pharmacol., 1994, sous presse), de souris (NAHMIAS et al., EMBO J., 1991, 10, 3721-3727), et de rat (GRANNEMAN et al., J. Pharmacol. Exp. Therap., 1991, 40, 895-899 ; MUZZIN et al., J. Biol. Chem., 1991, 266, 24053-24058).

Les ligands spécifiques du récepteur RA β_3 ont tous une valeur de K_{act} plus faible pour le récepteur RA β_3 bovin comparée aux récepteurs RA β_3 humain, de souris, et donc une meilleure efficacité à stimuler l'adénylate cyclase. Le (-)propranolol est agoniste partiel sur RA β_3 bovin comme pour le récepteur RA β_3 humain. Par contre, le bupranolol, qui est décrit comme un antagoniste puissant pour les récepteurs RA β_3 humain et murin, est agoniste partiel sur le récepteur RA β_3 bovin.



5

10

15

20

25

30

35

| LIGANDS | RA β 3-CHO de souris Liaison Ki (nM) | RA β 3-CHO de souris Accumul. AMPC Kact (nM) AI | RA β 3-CHO humain Liaison Ki (nM) | RA β 3-CHO humain Accumul. AMPC Kact (nM) AI | RA β 3-CHO bovin Liaison Ki (nM) | RA β 3-CHO bovin Accumul. AMPC Kact (nM) AI |
|---|--|---|---|--|--|---|
| agonistes β 1/ β 2/ β 3 | | | | | | |
| (-)-isoprotérénol | - | 99 \pm 44 | 1,4 \pm 0,1 | 4 | 0,9 | 14 \pm 2,7 |
| (-)-épinéphrine | 4.600 \pm 1.850 | 23 \pm 0,3 | 0,91 \pm 0,03 | 49 \pm 5 | 1,00 \pm 0,04 | 50,7 \pm 3,7 |
| (-)-norépinéphrine | 1.840 \pm 600 | 13 \pm 4 | 1,06 \pm 0,06 | 6,3 \pm 0,7 | 1,00 | 54 \pm 4,3 |
| BRL 37344 | 290 \pm 136 | 0,4 \pm 0,1 | 1,07 \pm 0,08 | 15 \pm 3 | 1,11 \pm 0,12 | 0,3 \pm 0,07 |
| antagonistes β 1/ β 2/agonist β 3 | | | | | | |
| CGP 12177A | 152 \pm 19 | 41 \pm 9 | 0,75 \pm 0,08 | 139 \pm 44 | 0,68 \pm 0,02 | 1,41 \pm 0,5 |
| ICI 201651 | 239 \pm 104 | 15 \pm 1 | 1,02 \pm 0,02 | 20 \pm 9 | 1,14 \pm 0,14 | 1,1 \pm 0,9 |
| Bucindolol | 21 \pm 5 | 40 \pm 14 | 1,11 \pm 0,06 | 7,0 \pm 1,2 | 1,01 \pm 0,10 | 12,8 \pm 5,0 |
| agoniste/antagoniste partiel | | | | | | |
| (-)-propranolol | 150 \pm 22 | antagoniste 406 \pm 98 | - | 1.490 \pm 550 | 0,51 \pm 0,12 | 661 \pm 78 |
| antagonistes β 1/ β 2/ β 3 | | | | | | |
| (-)-bupranolol | 42 \pm 19 | antagoniste 12 \pm 1 | - | antagoniste | - | 507 \pm 75 |

0,34 \pm 0,0185 \pm 40

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: VETIGEN
 (B) RUE: 66 rue de Javel
 (C) VILLE: PARIS
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 75015

(A) NOM: VIRBAC
 (B) RUE: 1ere Avenue - 2065 M - L.I.D.
 (C) VILLE: CARROS
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 06516

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LE
 RECEPTEUR BETA3-ADRENERGIQUE BOVIN ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE DEPOT: FR 93 04670
 (B) DATE DE DEPOT: 21-APR-1993

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2000 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 107..1324
 (D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /function= "Bovin beta-3 receptor"
 /product= "Adrenergic, Beta Receptor"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

CCCAGGCCAG GGAAATCGCT CCCACGCCCC GATGCCCCCG CCGCTGAGCA GGGTGAGCTG      60
GGAGACCCTT TCCCTCATTC CTTCCCGCCC CACGCGCGAC GCGGGG ATG GCT CCG      115
                                     Met Ala Pro
                                     1

TGG CCT CCT GGG AAC AGC TCT CTG ACC CCG TGG CCA GAT ATC CCC ACC      163
Trp Pro Pro Gly Asn Ser Ser Leu Thr Pro Trp Pro Asp Ile Pro Thr
      5              10              15

CTG GCA CCC AAT ACT GCC AAC GCG AGT GGG CTG CCA GGG GTG CCC TGG      211
Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Pro Trp
      20              25              30              35

GCG GTG GCG CTG GCG GGG GCG CTG TTG GCG CTA GCG GTG CTG GCC ACC      259
Ala Val Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Val Leu Ala Thr

```

| 40 | 45 | 50 | |
|---|----|----|------|
| GTG GGA GGC AAC CTG CTG GTA ATC GTG GCC ATC GCC CGG ACG CCG AGA Val Gly Gly Asn Leu Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Arg Thr Pro Arg 55 60 65 | | | 307 |
| CTC CAG ACC ATG ACC AAC GTG TTC GTG ACT TCG CTG GCC ACA GCC GAC Leu Gln Thr Met Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala Thr Ala Asp 70 75 80 | | | 355 |
| CTG GTG GTG GGG CTC CTG GTC GTG CCC CCG GGG GCC ACG TTG GCG CTG Leu Val Val Gly Leu Leu Val Val Pro Pro Gly Ala Thr Leu Ala Leu 85 90 95 | | | 403 |
| ACC GGC CAC TGG CCC CTG GGC GTC ACC GGT TGC GAG CTG TGG ACC TCA Thr Gly His Trp Pro Leu Gly Val Thr Gly Cys Glu Leu Trp Thr Ser 100 105 110 115 | | | 451 |
| GTG GAC GTG CTG TGT GTG ACC GCC AGC ATC GAA ACC CTG TGC GCC CTG Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Ala Leu 120 125 130 | | | 499 |
| GCG GTG GAC CGC TAC CTG GCC GTG ACC AAC CCG CTG CGC TAC GGC GCG Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Thr Asn Pro Leu Arg Tyr Gly Ala 135 140 145 | | | 547 |
| CTG GTC ACC AAA CGC CGC GCC CTA GCA GCC GTG GTC CTG GTG TGG GTG Leu Val Thr Lys Arg Arg Ala Leu Ala Ala Val Val Leu Val Trp Val 150 155 160 | | | 595 |
| GTG TCC GCC GCG GTG TCG TTT GCG CCC ATC ATG AGC AAA TGG TGG CGC Val Ser Ala Ala Val Ser Phe Ala Pro Ile Met Ser Lys Trp Trp Arg 165 170 175 | | | 643 |
| ATC GGG GCC GAT GCC GAG GCG CAG CST TGC CAC TCC AAC CCG CGC TGC Ile Gly Ala Asp Ala Glu Ala Gln Arg Cys His Ser Asn Pro Arg Cys 180 185 190 195 | | | 691 |
| TGC ACC TTC GCC TCC AAC ATG CCC TAC GCG CTG CTC TCC TCC TCG GTC Cys Thr Phe Ala Ser Asn Met Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Ser Ser Val 200 205 210 | | | 739 |
| TCG TTC TAT CTT CCG CTC CTG GTG ATG CTC TTC GTC TAC GCA CGA GTT Ser Phe Tyr Leu Pro Leu Leu Val Met Leu Phe Val Tyr Ala Arg Val 215 220 225 | | | 787 |
| TTC GTG GTG GCC ACG CGC CAG CTG CCG TTG CTG CGC CCG GAG CTG GGT Phe Val Val Ala Thr Arg Gln Leu Arg Leu Leu Arg Glu Leu Gly 230 235 240 | | | 835 |
| CGC TTC CCG CCA GAG GAG TCT CCG CCG GCT CCT TCT CGC TCC GGA TCC Arg Phe Pro Pro Glu Glu Ser Pro Pro Ala Pro Ser Arg Ser Gly Ser 245 250 255 | | | 883 |
| CCT GGC CTG GCG GGG CCG TGC GCC TCG CCC GCG GGG GTG CCC TCC TAC Pro Gly Leu Ala Gly Pro Cys Ala Ser Pro Ala Gly Val Pro Ser Tyr 260 265 270 275 | | | 931 |
| GGC CGG CGG CCG GCG CGC CTT CTG CCT CTG CGG GAA CAC CGC GCC CTG Gly Arg Arg Pro Ala Arg Leu Leu Pro Leu Arg Glu His Arg Ala Leu 280 285 290 | | | 979 |
| CGC ACC TTG GGG CTC ATC ATG GGA ACC TTC ACT CTC TGC TGG TTG CCT Arg Thr Leu Gly Leu Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro 295 300 305 | | | 1027 |
| TTC TTT GTG GTC AAC GTG GTG CCG GCC CTC GGG GGC CCC TCT CTG GTG Phe Phe Val Val Asn Val Val Arg Ala Leu Gly Gly Pro Ser Leu Val 310 315 320 | | | 1075 |

| | |
|---|------|
| TCC GGC CCC ACT TTC CTC GCC CTT AAC TGG CTG GGC TAT GCC AAC TCT Ser Gly Pro Thr Phe Leu Ala Leu Asn Trp Leu Gly Tyr Ala Asn Ser 325 330 335 | 1123 |
| GCC TTC AAC CCG CTC ATC TAC TGC CGC AGC CCG GAC TTT CGG AGC GCC Ala Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ser Ala 340 345 350 355 | 1171 |
| TTC CGC CGC CTG CTG TGT CGC TGC CGG CCG GAG GAG CAC CTC GCC GCT Phe Arg Arg Leu Leu Cys Arg Cys Arg Pro Glu Glu His Leu Ala Ala 360 365 370 | 1219 |
| GCC TCC CCG CCC CGA GCC CCC TCC GGC GCC CCC ACG GCC CTG ACC AGC Ala Ser Pro Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Pro Thr Ala Leu Thr Ser 375 380 385 | 1267 |
| CCC GCT GGC CCC ATG CAG CCC CCA GAG CTC GAC GGG GCT TCC TGC GGA Pro Ala Gly Pro Met Gln Pro Pro Glu Leu Asp Gly Ala Ser Cys Gly 390 395 400 | 1315 |
| CTT TCT TAGGCCTTGA AGAAACAACCT CCATTGATCC GGAACCTTTG GAAAGCCTCT Leu Ser 405 | 1371 |
| GGCCCGCCTC GGTTCAGAAT GAGCCCCGTG GAGTTTCCCA GCTGGAAAAC TCTGCCCTCC | 1431 |
| CCAGCCTGAC GACTGGGTCC TGGGAGGAGG CGCGGGGGCT GACTGGGGAG GGGAAATCCT | 1491 |
| TACCAAGTGG GTTTTCGCTC TCTTTCTGAG AGAAGTTTTT CACACCCAG CCCTGAACTT | 1551 |
| CACCGCTGCC TCAGCAGCTC CCGCGTCTGG TTTCCCATGC CCAGGTGCCC GGGCAGGAGC | 1611 |
| TGGGCTGCGT TTAGCCCCGG GACCCGCACC TGTCCCCTC GGGTGCTGTG TGCGCAGGGG | 1671 |
| CAAGGCGGGC ACCTTCATTC TGTTCCTTCT GCCGCCCAGA CCCTGAGGAA CCCACCGGGG | 1731 |
| TGCTGGAGGC CCAGGCTGAG AAGAGGAAGG TGGGGAAGGT CACGGTTTGG GCTTCTGTCC | 1791 |
| CTGGCTTCCT CACTGTAGAC ACACCTACCT CACAGCATTT TCAGGACTTT ACTTTAGCCT | 1851 |
| TTGGGGTGGG GGTGGGGGGG CGCTCCTGGT TTCCTGGGAA GGTGAACCAT TAGAATGGGT | 1911 |
| CCCTTTTCCT TTTGAAATCA AATTAATAAA TGTTACTGAA TGCAGTTTAA AAAAAAAAAA | 1971 |
| AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA | 2000 |

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 405 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine


(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Pro | Trp | Pro | Pro | Gly | Asn | Ser | Ser | Leu | Thr | Pro | Trp | Pro | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ile | Pro | Thr | Leu | Ala | Pro | Asn | Thr | Ala | Asn | Ala | Ser | Gly | Leu | Pro | Gly |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Val | Pro | Trp | Ala | Val | Ala | Leu | Ala | Gly | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu | Ala | Val |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Leu | Ala | Thr | Val | Gly | Gly | Asn | Leu | Leu | Val | Ile | Val | Ala | Ile | Ala | Arg |
| | | | 50 | | | 55 | | | | 60 | | | | | |

29

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Thr 65 | Pro | Arg | Leu | Gln | Thr 70 | Met | Thr | Asn | Val | Phe 75 | Val | Thr | Ser | Leu | Ala 80 |
| Thr | Ala | Asp | Leu | Val 85 | Val | Gly | Leu | Leu | Val 90 | Val | Pro | Pro | Gly | Ala 95 | Thr |
| Leu | Ala | Leu | Thr 100 | Gly | His | Trp | Pro | Leu | Gly 105 | Val | Thr | Gly | Cys 110 | Glu | Leu |
| Trp | Thr 115 | Ser | Val | Asp | Val | Leu | Cys 120 | Val | Thr | Ala | Ser | Ile 125 | Glu | Thr | Leu |
| Cys 130 | Ala | Leu | Ala | Val | Asp | Arg 135 | Tyr | Leu | Ala | Val | Thr 140 | Asn | Pro | Leu | Arg |
| Tyr 145 | Gly | Ala | Leu | Val | Thr 150 | Lys | Arg | Arg | Ala | Leu 155 | Ala | Ala | Val | Val | Leu 160 |
| Val | Trp | Val | Val 165 | Ser | Ala | Ala | Val | Ser | Phe 170 | Ala | Pro | Ile | Met | Ser 175 | Lys |
| Trp | Trp | Arg 180 | Ile | Gly | Ala | Asp | Ala 185 | Glu | Ala | Gln | Arg | Cys | His 190 | Ser | Asn |
| Pro | Arg | Cys 195 | Cys | Thr | Phe | Ala | Ser 200 | Asn | Met | Pro | Tyr 205 | Ala | Leu | Leu | Ser |
| Ser 210 | Ser | Val | Ser | Phe | Tyr | Leu 215 | Pro | Leu | Leu | Val | Met 220 | Leu | Phe | Val | Tyr |
| Ala 225 | Arg | Val | Phe | Val 230 | Val | Ala | Thr | Arg | Gln | Leu 235 | Arg | Leu | Leu | Arg | Arg 240 |
| Glu | Leu | Gly | Arg 245 | Phe | Pro | Pro | Glu | Glu | Ser 250 | Pro | Pro | Ala | Pro | Ser 255 | Arg |
| Ser | Gly | Ser 260 | Pro | Gly | Leu | Ala | Gly 265 | Pro | Cys | Ala | Ser | Pro | Ala | Gly 270 | Val |
| Pro | Ser 275 | Tyr | Gly | Arg | Arg | Pro | Ala 280 | Arg | Leu | Leu | Pro | Leu 285 | Arg | Glu | His |
| Arg 290 | Ala | Leu | Arg | Thr | Leu | Gly 295 | Leu | Ile | Met | Gly 300 | Thr | Phe | Thr | Leu | Cys |
| Trp 305 | Leu | Pro | Phe | Phe 310 | Val | Val | Asn | Val | Val | Arg 315 | Ala | Leu | Gly | Gly | Pro 320 |
| Ser | Leu | Val | Ser 325 | Gly | Pro | Thr | Phe | Leu | Ala 330 | Leu | Asn | Trp | Leu | Gly 335 | Tyr |
| Ala | Asn | Ser 340 | Ala | Phe | Asn | Pro | Leu 345 | Ile | Tyr | Cys | Arg | Ser | Pro 350 | Asp | Phe |
| Arg | Ser 355 | Ala | Phe | Arg | Arg | Leu | Leu 360 | Cys | Arg | Cys | Arg | Pro | Glu | Glu | His |
| Leu 370 | Ala | Ala | Ala | Ser | Pro | Pro | Arg 375 | Ala | Pro | Ser | Gly 380 | Ala | Pro | Thr | Ala |
| Leu 385 | Thr | Ser | Pro | Ala | Gly 390 | Pro | Met | Gln | Pro | Pro 395 | Glu | Leu | Asp | Gly | Ala 400 |
| Ser | Cys | Gly | Leu | Ser 405 | | | | | | | | | | | |

No de la demanda internacional: PCT/

| MICRO-ORGANISMES | |
|---|------------|
| Fondos financieros relativos al micro-organismo mencionado en el caso 12 ... Eje 12-13 de la documentación | |
| A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT | |
| D'autres copies sont déposées sur une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/> | |
| Nom de l'institution de dépôt | |
| Collection Nationale de Cultures de Microorganismes | |
| Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) | |
| 28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15 | |
| Date du dépôt | N° d'ordre |
| 15 avril 1993 | I-1297 |
| D. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/> | |
| <p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p> | |
| C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés) | |
| AUSTRALIE CANADA ETATS-UNIS D'AMERIQUE EUROPE JAPON NOUVELLE-ZELANDE | |
| D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (à ne remplir que si nécessaire) | |
| Les indications énumérées ci-dessus seront soumises ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., s'ne d'ordre du dépôt) | |
| 2. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office receveur) | |
| (Fonctionnaire autorisé)  | |
| <input type="checkbox"/> Date de réception (ou provenance du déposant) par le Bureau international | |
| (Fonctionnaire autorisé) | |

(Janvier 1995)

REVENDECATIONS

1') Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle correspond à l'ADNc du gène bovin codant pour le récepteur adrénergique $\beta 3$ bovin.

5 2') Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence en nucléotides et la séquence déduite en aminoacides SEQ ID n° 1.

10 3') Séquence selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend notamment les sites de restriction uniques suivants :

Bpu1102 I, Fok I, EcoR V, Bcg I, Nhe I, BspM I, Afl III, Age I, BstE II, BspH I, Bsg I, Nsp I, Nsp7524 I, NspC I, Sap I, BamH I, BstY I, Asc I, Sty I, 15 Hinc II, Apa I, Bsp120 I, Bbe I, Ehe I, Kas I, Nar I, Ecl136 I, Sac I, Stu I, Fse I, Drd I, Tth111 I, Srf I, Bsu36 I, Sfc I, BstX I, Ase I, Bsm I, Dra I.

20 4') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 78 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 218-295 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM1.

25 5') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 72 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 332-403 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM2.

30 6') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 66 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 434-499 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM3.

35 7') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un segment de 69 paires de bases, qui

correspond aux nucléotides 572-640 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM4.

8') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il
5 est constitué d'un segment de 72 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 713-784 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM5.

9') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il
10 est constitué d'un segment de 66 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 983-1048 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM6.

10') Fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il
15 est constitué d'un segment de 78 paires de bases, qui correspond aux nucléotides 1070-1147 de la séquence ID n° 1, lequel fragment code pour la région transmembranaire TM7.

20 11') Clones d'ADNc, caractérisés en ce qu'ils comprennent un fragment de séquence codant pour le récepteur $\beta 3$ bovin (RA-Bo $\beta 3$), selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

12') Clone selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend 2979 paires de bases, inclut la
25 séquence ID n° 1 selon la revendication 2 et comprend les sites de restriction uniques suivants : EcoR V, Bcg I, Nhe I, BstE II, BspH I, Bsg I, Sap I, BamH I, Asc I, Stu I, Fse I, Drd I, Srf I, Sfc I, Ase I, Bsm I, Dra I,
30 Bsp1407 I, Csp6 I, Rsa I, Ssp I, Dra III, Bgl II, Afl II, Spe I, Tfi I, Hpa I, Nde I, EcoN I, BsaB I, Pvu I.

13') Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou
35 un fragment de celles-ci, marquées à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un

fluorochrome et en ce qu'elles s'hybrident avec les séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 mais ne s'hybrident pas avec les gènes codant pour les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, ni avec
5 l'ARN messager desdits récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques.

14') Sonde selon la revendication 13, caractérisée en ce que sa séquence est homologue ou complémentaire de celle d'un segment d'au moins 10 pb de la séquence ID n° 1.

10 15') Peptide et/ou un fragment de peptide, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 et en ce qu'il présente une activité de récepteur $\beta 3$ -adrénergique.

15 16') Peptide selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend 405 amino-acides et présente la séquence en amino-acides SEQ ID n° 2.

17') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
20 26 amino-acides, correspondant au segment 38-63 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM1.

18') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
25 24 amino-acides, correspondant au segment 76-99 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM2.

19') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
30 22 amino-acides, correspondant au segment 110-131 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM3.

20') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
35 23 amino-acides, correspondant au segment 156-178 de la

séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM4.

21') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
5 24 amino-acides, correspondant au segment 203-226 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM5.

22') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
10 22 amino-acides, correspondant au segment 293-314 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM6.

23') Fragment de peptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de
15 26 amino-acides, correspondant au segment 322-347 de la séquence ID n° 2 et constituant la région transmembranaire TM7.

24') Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une sé-
20 quence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

25') Vecteur selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur recombinant approprié, comprenant en particulier une origine de
25 répllication dans un microorganisme hôte approprié, notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçues ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un
30 promoteur permettant l'expression des gènes dans lesdites bactéries ou cellules eucaryotes, et dans lequel est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un peptide, d'un
35 fragment de peptide ou d'une combinaison de fragments de

peptide ayant une activité de récepteur $\beta 3$ adrénergique bovin.

26') Vecteur selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un vecteur d'expression
5 pRc/CMV dans lequel est inséré, au niveau du lieu multi-site, au moins le fragment codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin, et en ce qu'il a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 15 avril
10 1993 sous le n° I-1297.

27') Cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 24 à 26.

15 28') Cellule hôte selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle est constituée par les cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary).

29') Cellule hôte selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une bactérie, notamment *Escherichia coli*.
20

30') Procédé de sélection et d'identification de substances capables de se comporter comme ligand spécifique vis-à-vis d'un peptide (récepteur $\beta 3$ -adrénergique bovin) selon l'une quelconque des revendications 15 à 23,
25 lequel procédé comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 24 à 26, laquelle cellule hôte exprime ledit peptide bovin
30 (récepteur adrénergique $\beta 3$ bovin), le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance s'il y a lieu, et

35 - la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-peptide.

1/10

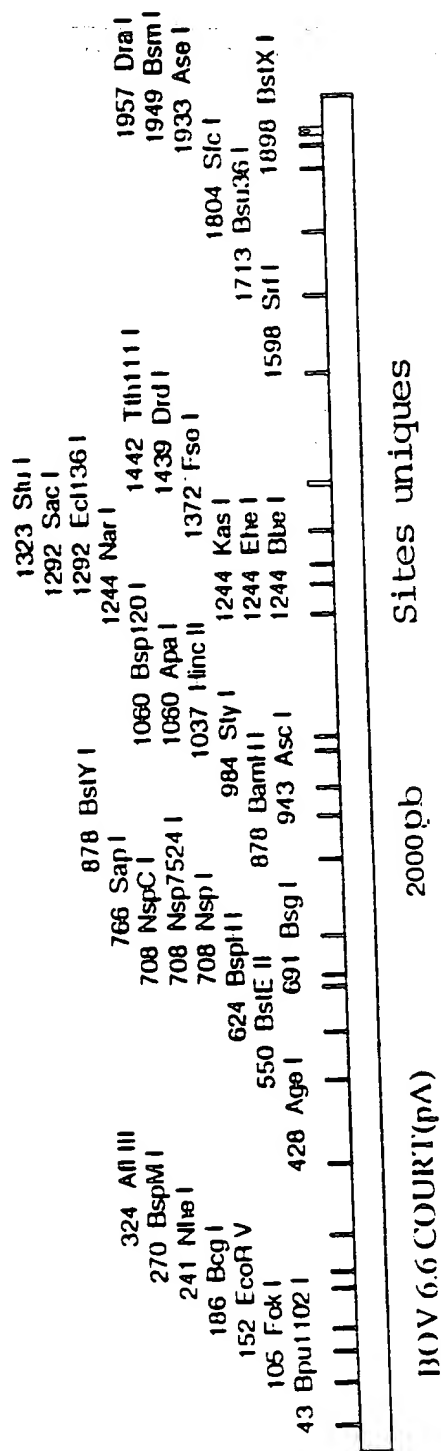


FIGURE 1a

2/10

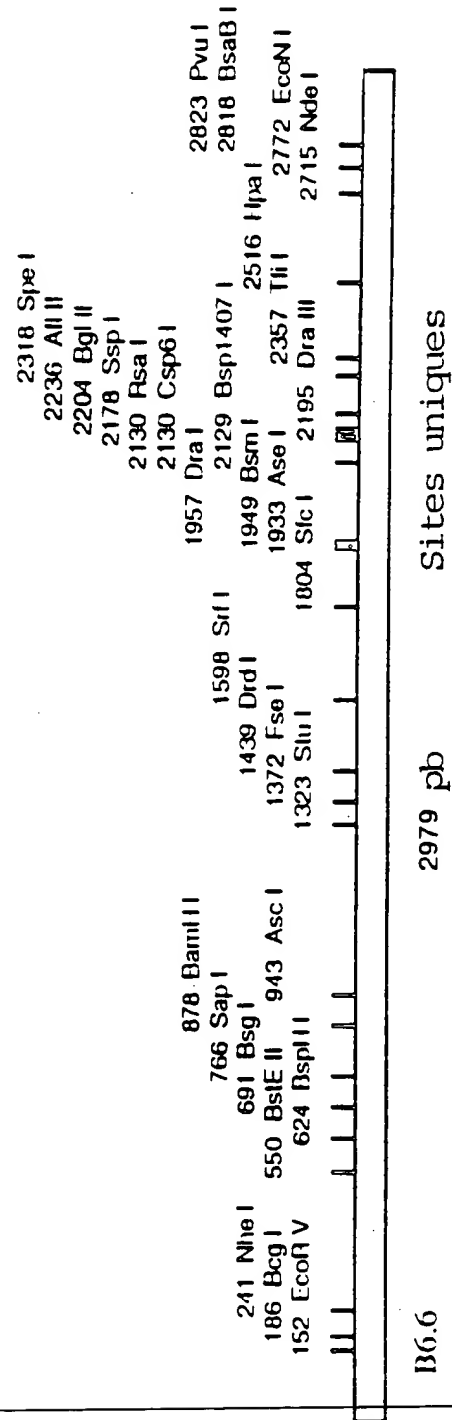


FIGURE 1b

1M1

MMA PWPPCGNSSLTPWPDIP T L A P N T A N S G L P G V P W A V A L A G A L L A L A V L A T V G G N L L V I V
MMA PWPHENSSLA WP D L P T L A P N T A N T S G L P G V P W E A A L A G A L L A L A V L A T V G G N L L V I V
MMA PWPHKNGSLAFWSDAPTLDPSAANTSGLPGVPWAAA LAGALLALA -- TVGGNLLVIT
MMA PWPHRNGSLALWSDAPTLDPSAANTSGLPGVPWAAA LAGALLALA -- TVGGNLLVI I *****

TMM3

AIA RT PRL Q T M T N V F V T S L A T A D L V G L L V V P P G A T L A L T G H W P L G V T G C E L W T S V D V L C
 AIA W T PRL Q T M T N V F V T S L A A A D L V M G L L V V P P A A T L A L T G H W P L G A T G C E L W T S V D V L C
 AIA R T PRL Q T I T N V F V T S L A T A D L V G L L V M P P G A T L A L T G H W P L G A T G C E L W T S V D V L C
 AIA R T PRL Q T I T N V F V T S L A A A D L V G L L V M P P G A T L A L T G H W P L G E T G C E L W T S V D V L C

TMA

VTASIELCALAVDRLAVTNPLRYGALVTKRRRLAAVLVWVVSAAVSFAPIMSQWWRV
VTASIELCALAVDRLAVTNPLRYGALVTKRCARITAVLVWVVSAAVSFAPIMSQWWRV
VTASIELCALAVDRLAVTNPLRYGTLTKRRRARA AVLWVVSATVSFAPIMSQWWRV
VTASIELCALAVDRLAVTNPLRYGTLTKRRRARA AVLWVVSAAVSFAPIMSQWWRV
VTASIELCALAVDRLAVTNPLRYGTLTKRRRARA AVLWVVSAAVSFAPIMSQWWRV

TMS

GADAEAQCHSNPRCCTFASNMPPYALLSSVSFYLPLLVMLEFVARVFVATQRLRLRR
GADAEAQCHSNPRCCAFASNMPYLLSSVSFYLPLLVMLEFVARVFVATQRLRLRRG
GADAEAQCHSNPRCCSFASNMPPYALLSSVSFYLPLLVMLEFVARVFVAKQRRLRR
GADAEAQCHSNPRCCSFASNMPPYALLSSVSFYLPLLVMLEFVARVFVAKQRHLLRR
GADAEAQCHSNPRCCSFASNMPPYALLSSVSFYLPLLVMLEFVARVFVAKQRHLLRR

FIGURE 2.1

BETA3 BOV
BETA3 HU
BETA3 RA
BETA3 MO

BETA3 BOV
BETA3 HU
BETA3 RA
BETA3 MO

BETA3 BOV
BETA3 HU
BETA3 RA
BETA3 MO

BETA3 BOV
BETA3 HU
BETA3 RA
BETA3 MO

FIGURE 2.2

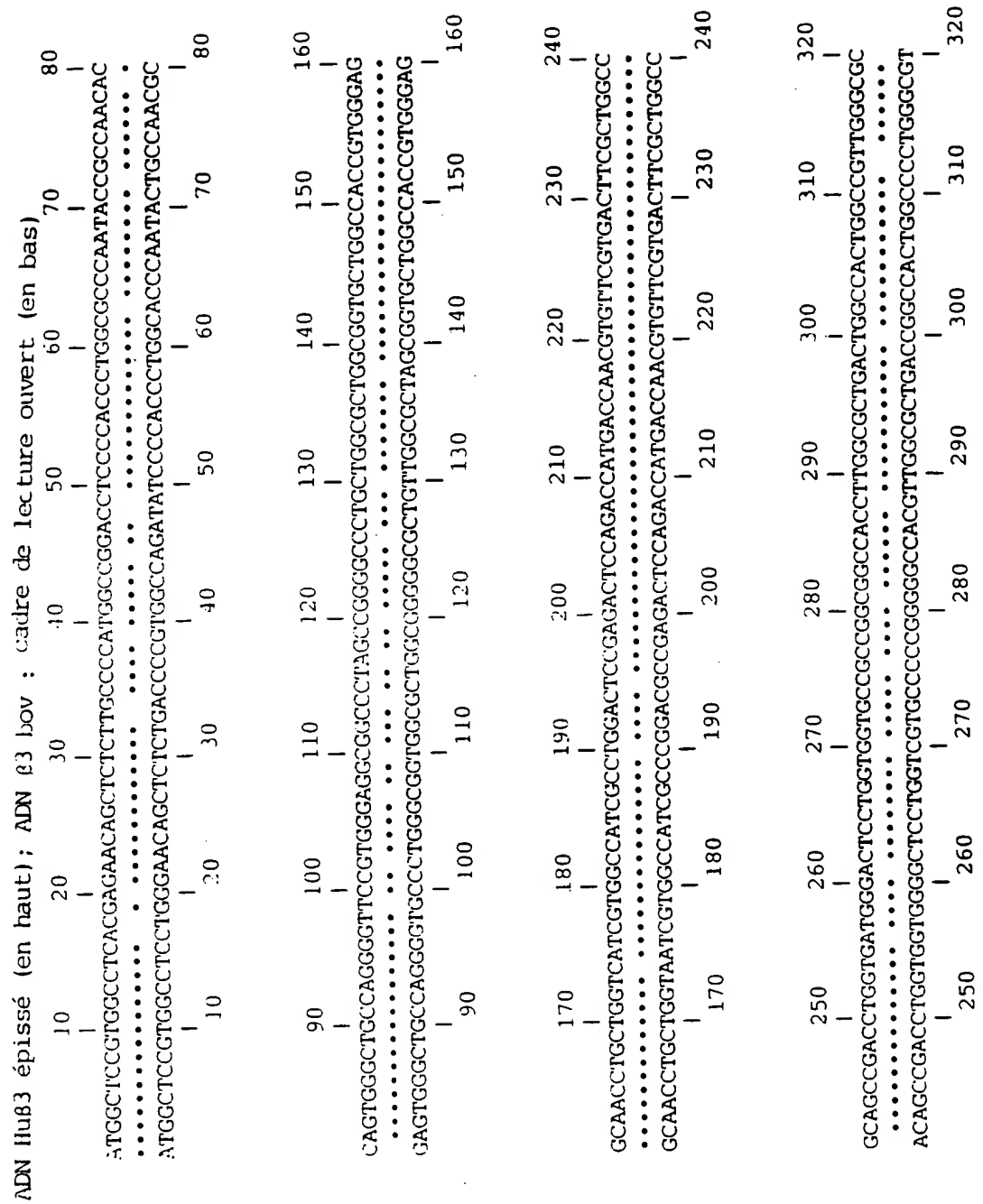


FIGURE 3.1

6/10

330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
CAC"UUCCTGCGAGCTGTGGACCTCGGTGGACGTGCTGTGTGACCGCCAGCATCGAAACCCCTGTGCGCCCTGGGCCGTGG
... ..
CACCGGTTGGCAGCTGTGGACCTCAGTGGACGTGCTGTGTGACCGCCAGCATCGAAACCCCTGTGCGCCCTGGCGGTGG
330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |

410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
ACCGCTACCTGGCTGTGACCAACCCGGCTGCGTTACGGCGCACTGGTCAACCAAGCGCTGCGCCCGGACAGCTGTGGTCTCTG
... ..
ACCGCTACCTGGCGGTGACCAACCCGGCTGCGCTACGGCGCGCTGGTCAACCAAGCGCGCCCTAGCAGCGGTGGTCTCTG
410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |

490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 |
GTGTGGGTGCTGTCGGCCCGGTGTCGTGTGCGCCCATCATGAGCCAGTGGTGGCGGTAGGGCCGACGCCAGGCGCA
... ..
GTGTGGGTGCTGTCGGCCCGGTGTCGTGTGCGCCCATCATGAGCAATGGTGGCGCATCGGGGCGCGATGCCGAGGCGCA
490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 |

570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 |
GCGCTGCCACTCCAACCCGGCTGCTGTGCTTCCGCTTCCAAACATGCCCTACGTGCTGCTTCCCTCCCTCCCTTCT
... ..
GCGTTGCCACTCCAACCCGGCTGCTGACCTTCCGCTTCCAAACATGCCCTACGCGTGGCTTCCCTCCCTCCCTTCT
570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 |

FIGURE 3.2

7/10

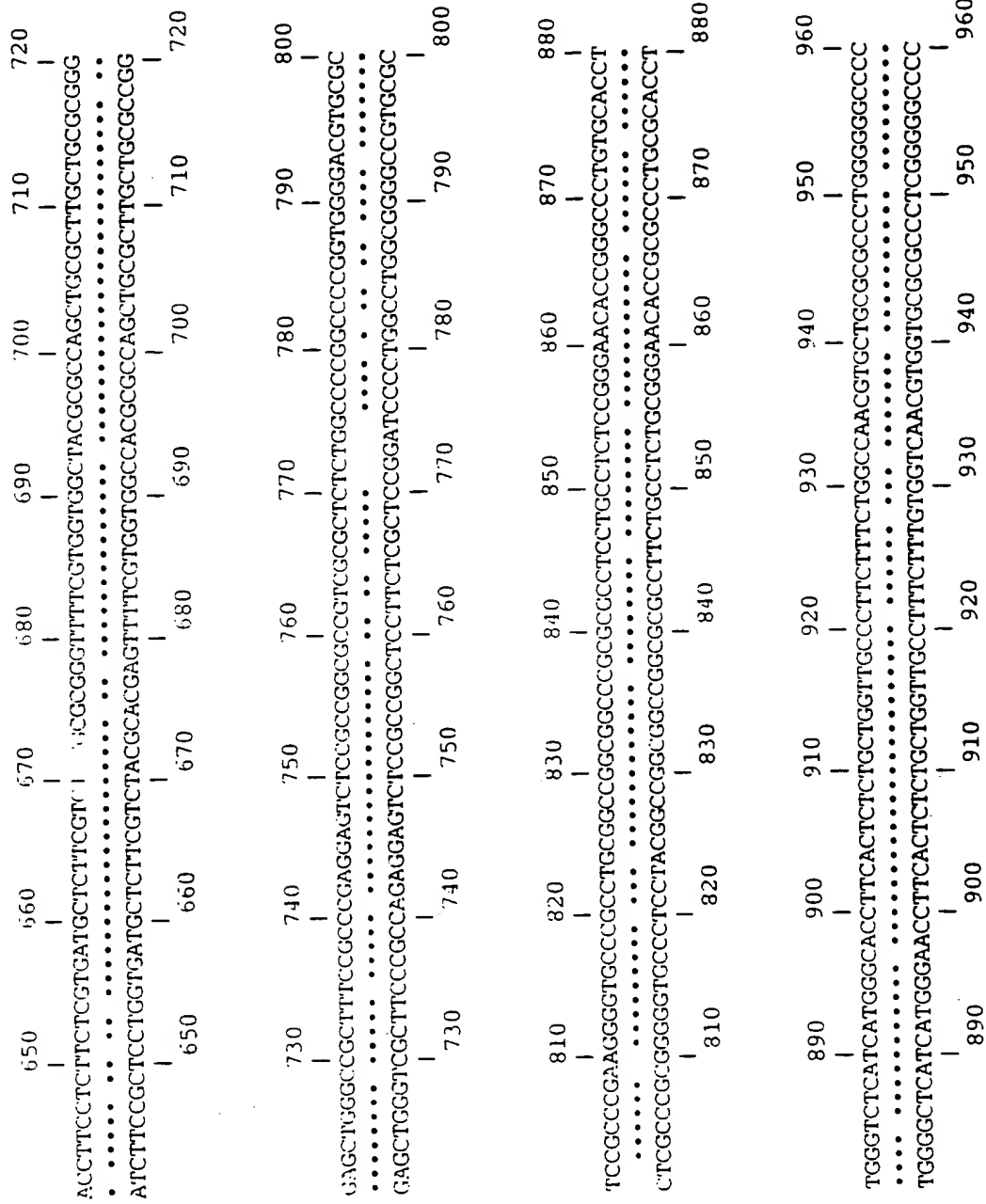
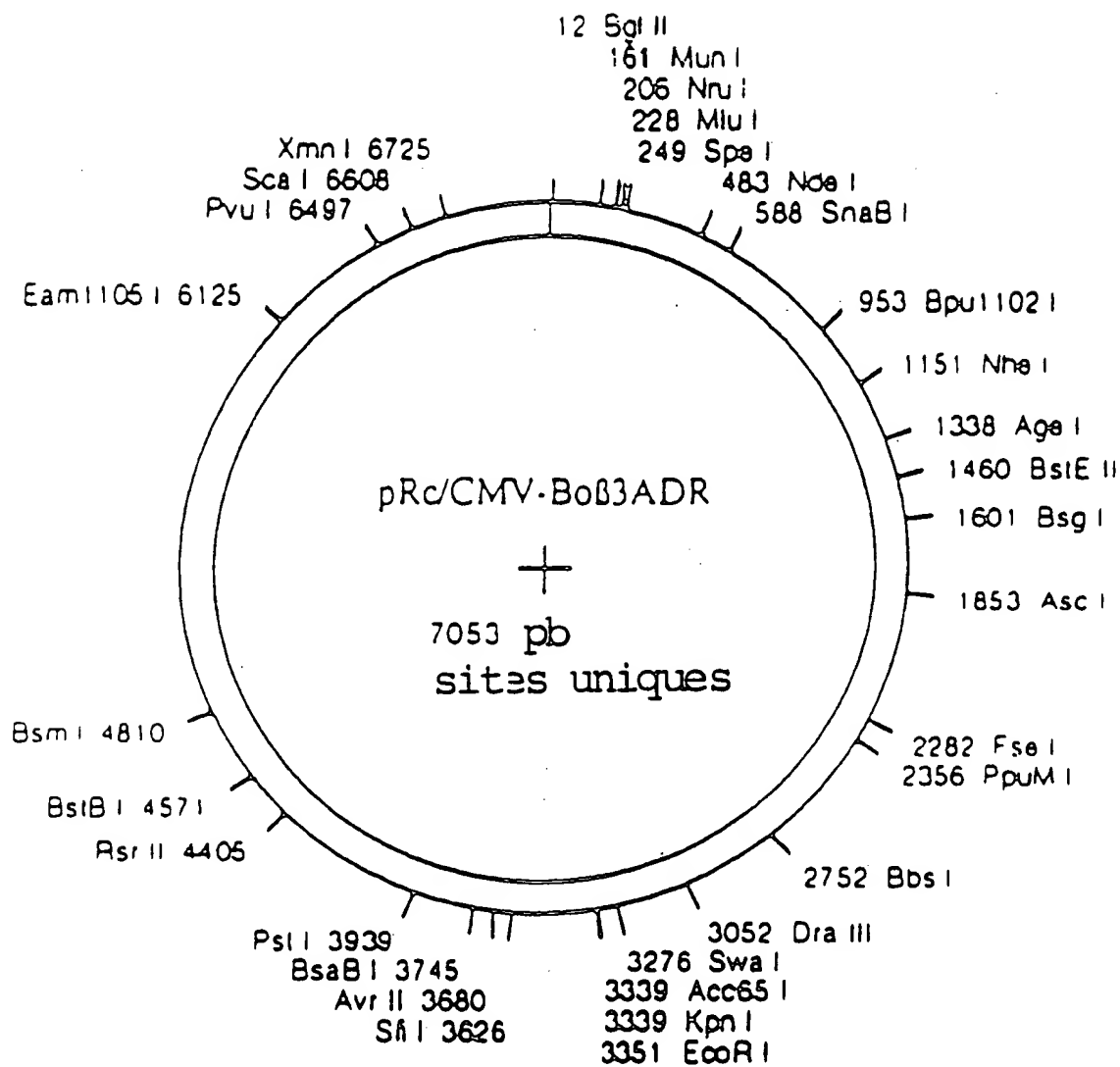


FIGURE 3.3

| | | | | | | | |
|--|---|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 |
| TCCTAGTCCCGGCGCCGGCTTTCCTTGCCCTTGAAC | TGGCTAGGTTATGCCAAATTC | TGCTTCAACCCGCTCATCTACTG | | | | | |
| | | | | | | | |
| TCCTCGGTGTCGGGCGCCACATTTCCTCGCCCTTAACT | TGGGCTATGCCAACTCTGCTTCAACCCGCTCATCTACTG | | | | | | |
| 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 |
| | | | | | | | |
| 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 |
| | | | | | | | |
| 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| | | | | | | | |
| 1210 | 1220 | | | | | | |
| | | | | | | | |
| 1200 | 1210 | | | | | | |
| | | | | | | | |

FIGURE 3.4

9/10

FIGURE 4

10/10

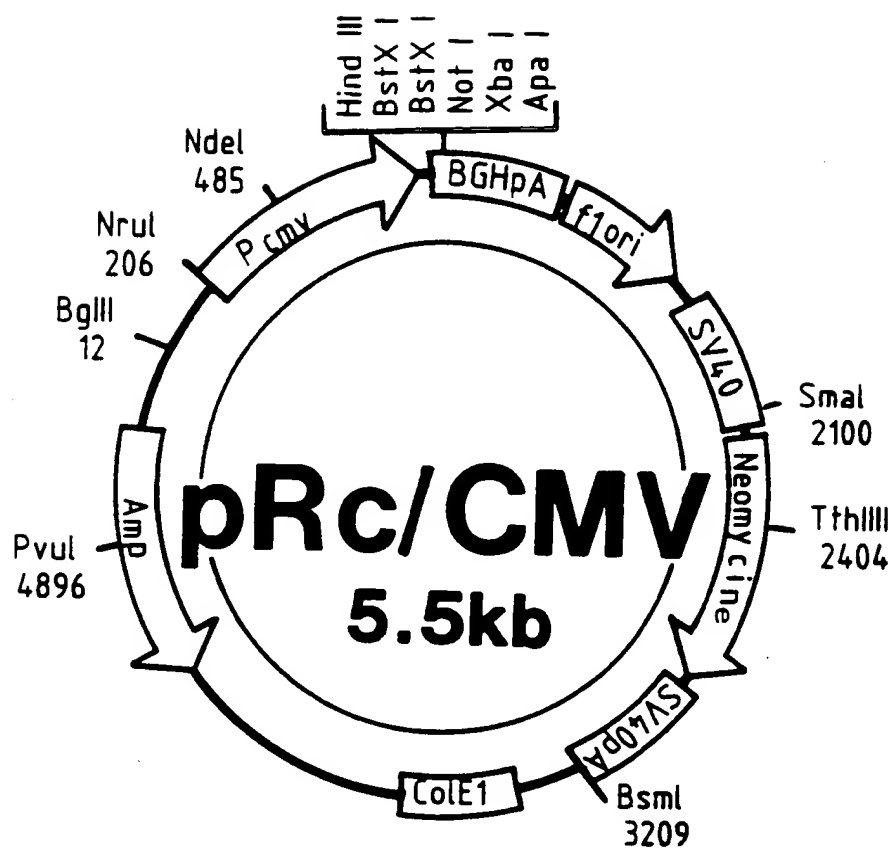


FIGURE 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/FR 94/00447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07K15/00 C12N15/12 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO,A,92 12246 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 23 July 1992 cited in the application see the whole document --- | 1-30 |
| X | FR,A,2 642 075 (INSTITUT PASTEUR) 27 July 1990 see the whole document & WO,A,90 08775 cited in the application --- | 1-30 |
| X | EMBL DATA LIBRARY Acc.Nr.: X67214, 18 janviers 1993, B.Stoffel et al., "Bovine beta3-adrenergic receptor, partial genomic sequence". --- -/-- | 4,5 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 1994

Date of mailing of the international search report

18 -08- 1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentmann 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00447

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ^o | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------------------|---|-----------------------|
| A | <p>EP, A, 0 351 921 (MERCK & CO. INC)</p> <p>24 January 1990</p> <p>see the whole document</p> <p>--</p> <p>-----</p> | 1-30 |
| | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 94/00447

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO-A-9212246 | 23-07-92 | FR-A- 2671559 EP-A- 0567577 JP-T- 6504915 | 17-07-92 03-11-93 09-06-94 |
| FR-A-2642075 | 27-07-90 | DE-D- 69005620 DE-T- 69005620 EP-A- 0455682 WO-A- 9008775 JP-T- 4504354 US-A- 5288607 | 10-02-94 21-07-94 13-11-91 09-08-90 06-08-92 22-02-94 |
| WO-A-9008775 | 09-08-90 | FR-A- 2642075 DE-D- 69005620 DE-T- 69005620 EP-A- 0455682 JP-T- 4504354 US-A- 5288607 | 27-07-90 10-02-94 21-07-94 13-11-91 06-08-92 22-02-94 |
| EP-A-0351921 | 24-01-90 | JP-A- 2084121 | 26-03-90 |



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C07K15/00 C12N15/12 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X | WO,A,92 12246 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 23 Juillet 1992 cité dans la demande voir le document en entier --- | 1-30 |
| X | FR,A,2 642 075 (INSTITUT PASTEUR) 27 Juillet 1990 voir le document en entier & WO,A,90 08775 cité dans la demande --- | 1-30 |
| X | EMBL DATA LIBRARY Acc.Nr.: X67214, 18 janvier 1993, B.Stoffel et al., "Bovine beta3-adrenergic receptor, partial genomic sequence". --- -/-- | 4,5 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26 Juillet 1994

18 -08- 1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentmann 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | <p>EP,A,0 351 921 (MERCK & CO. INC.) 24 Janvier 1990 voir le document en entier -----</p> | 1-30 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets



Demander / Internationale No

PCT/FR 94/00447

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO-A-9212246 | 23-07-92 | FR-A- 2671559 | 17-07-92 |
| | | EP-A- 0567577 | 03-11-93 |
| | | JP-T- 6504915 | 09-06-94 |
| ----- | | | |
| FR-A-2642075 | 27-07-90 | DE-D- 69005620 | 10-02-94 |
| | | DE-T- 69005620 | 21-07-94 |
| | | EP-A- 0455682 | 13-11-91 |
| | | WO-A- 9008775 | 09-08-90 |
| | | JP-T- 4504354 | 06-08-92 |
| | | US-A- 5288607 | 22-02-94 |
| ----- | | | |
| WO-A-9008775 | 09-08-90 | FR-A- 2642075 | 27-07-90 |
| | | DE-D- 69005620 | 10-02-94 |
| | | DE-T- 69005620 | 21-07-94 |
| | | EP-A- 0455682 | 13-11-91 |
| | | JP-T- 4504354 | 06-08-92 |
| | | US-A- 5288607 | 22-02-94 |
| ----- | | | |
| EP-A-0351921 | 24-01-90 | JP-A- 2084121 | 26-03-90 |
| ----- | | | |

